

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 491—500

Zur quantitativen immunologischen Bestimmung von Serumproteinen

VON R. LAMERZ, A. FATEH-MOGHADAM UND M. KNEDEL^{1,2)}

I. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. H. Schwiege) der Universität München und Klinisch-Chemisches Institut (Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. M. Knedel) am Städtischen Krankenhaus München-Harlaching

(Eingegangen am 23. Januar/13. April 1973)

Es wird über ein verbessertes Auswerteverfahren der einfachen radialen Immunodiffusion nach der Methode von MANCINI (Immunochimistry 2, 235—254 (1965)) anhand der Auswertung von 1053 Partigenplatten der Fa. Behringwerke bei 10 Serumproteinen berichtet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Standardgeraden durch Erstellung einer linearen Regressionsgleichung aus den Standard-Konzentrationen mit zugehörigen Präzipitatsflächen. Aufgrund des direkten Vergleichs der einzelnen Regressionsgeraden für die verschiedenen Serumproteine und unter Berücksichtigung der Chargen muß für jede Partigenplatte eine eigene Regressionsgleichung gefordert werden. Bei Prüfung der Genauigkeit der Methode ließ sich eine Gesamtstreuung zwischen 2,4% (Transferrin) und 7,1% (IgG) feststellen. Verschiedene andere Auswertungsverfahren erwiesen sich dem von uns beschriebenen als unterlegen. Neben diesen Befunden werden Tripartigenplatten (IgG, IgA, IgM) der Fa. Behringwerke und Immunoplates der Fa. Hyland für 8 Serumproteine verglichen. Dabei zeigte sich, daß die auf Immunoplates durchgeführte Auswertung nach der Methode von FAHEY (J. Immunol. 94, 84—90 (1965), lineare Beziehung zwischen Durchmesser des Präzipitats und dem Logarithmus der Konzentration) der MANCINI-Methode (lineare Beziehung zwischen Präzipitatsfläche und der Konzentration) an Genauigkeit durchaus ebenbürtig und ebenso für Kleinrechner programmierbar ist. Die im Vergleich zur MANCINI-Methode auf Partigenplatten gefundenen Unterschiede waren nicht methodisch bedingt, sondern auf die nicht vergleichbaren unterschiedlichen Konzentrationsangaben der Standards beider Firmen zurückzuführen.

The quantitative immunological determination of serum proteins

An improved evaluation procedure for the simple radial immunodiffusion method of MANCINI (Immunochimistry 2, 235—254 (1965)) is reported for 10 serum proteins, using 1053 Partigen plates from Behringwerke. A calibration line was established from the linear regression of the standard concentration and the corresponding areas of precipitation. A regression analysis was performed for each Partigen plate by the direct comparison of the individual regression lines for the different serum proteins, taking the differences between batches into account. The results showed a scatter of between 2.4% (transferrin) and 7.1% (IgG). Other methods of evaluation were found to be less accurate. The Tripartigen plates (IgG, IgA, IgM) from Behringwerke and Immunoplates from Hyland were also compared for 8 serum proteins. It was found that the evaluation on Immunoplates by the method of FAHEY (J. Immunol. 94, 84—90 (1965)) (linear relationship between diameter of precipitation and logarithm of the concentration) and by the MANCINI method (linear relationship between precipitation area and concentration) are equally accurate, and both can be programmed on a calculating machine. The method on Partigen plates showed differences from the MANCINI method, which were not due to a lack of agreement between the two methods, but to differences in the stated concentrations of the standards from the two firms.

Die Methode der einfachen radialen Immunodiffusion wird in zwei Modifikationen angewandt, für die auch handelsübliche Immunodiffusionsplatten erhältlich sind. Nach den Verfahren von MANCINI (1) besteht zwischen der terminalen Präzipitationsfläche und der Antigenkonzentration eine lineare Beziehung. Nach diesem Verfahren werden die Partigenplatten der Fa. Behringwerke ausgewertet. Die Modifikation von FAHEY (2) nützt die lineare Beziehung zwischen dem Präzipitats-Durchmesser eines noch diffundierenden Antigens und dem Logarithmus der Antigenkonzentration aus. Eine Anwendung dieses Verfahrens erfolgt mit den handelsüblichen Immunoplates der Fa. Hyland/Travenol. In der vorliegenden Arbeit wird über unsere Erfahrungen mit der einfachen radialen Immunodiffusionsmethode nach MANCINI in der Mikromodifikation von AUGENER (3) anhand der Auswertung von 1050 handelsüblichen Partigen-Platten berichtet, die im Vergleich mit selbst hergestellten Platten eine gute Übereinstimmung zeigten (4). Dabei wird ein verbessertes und vereinfachtes Auswerteverfahren unter Verwendung eines Meß-Mikroskops und einer elektronischen

Rechenmaschine beschrieben. Ferner wird ein Vergleich mit Tripartigen-Platten sowie Immuno-Plates der Fa. Hyland/Travenol und derer Standards gezogen.

Methodik

Prinzip

Im Prinzip diffundieren bei der einfachen radialen Immunodiffusion die Antigenmoleküle radial von einem runden Startloch aus in eine mit homologem spezifischen Antiserum vermischte Agargelschicht, wobei sie einen mit der Zeit konzentrisch wachsenden Präzipitationszylinder bilden, dessen innerer Rand vom Antigenbehälter gebildet wird und dessen äußere Begrenzung der besonders gut sichtbare Präzipitationsring darstellt. Dieser wandert konzentrisch bis zur Ausbildung eines stabilen Gleichgewichts der Äquivalenz von Antigen- und Antikörperkonzentration d. h. bis alles diffundierende Antigen vom homologen Antikörper gebunden ist.

Nach der Modifikation von MANCINI steht die nach vollständig beendeter Diffusion erreichte terminale Präzipitatsfläche in direkter linearer Beziehung zur vorgegebenen Antigenmenge:

¹⁾ Die Autoren sind Mitglieder des SFB 37 „Restitution und Substitution innerer Organe“ München.

²⁾ Das hier verwendete Konzentrationsmaß 10^{-2} g/l entspricht mg/100 ml.

$$F_G = F_0 + cQ_{AG}$$

F_G = Präzipitatfläche + Antigen-Reservoir-Fläche

Q_{AG} = Antigenmenge.

Die grafische Darstellung der Funktionsgleichung ist eine Gerade mit der Steigung c und dem Ordinatenabschnitt F_0 .

Nach den Untersuchungen von MANCINI (1) ist die Steigung c eine Funktion der Antiserumkonzentration. Je höher die verwendete Antikörperkonzentration, desto kleiner die Steigung c . Der Wert F_0 (Ordinatenabschnitt) hängt mit der Größe der Antigenbehälterfläche zusammen: Je größer das Antigen-Reservoir, um so größer auch der F_0 -Wert. Auch wachsende Lösungsmittelvolumina führen zu einem Anstieg des F_0 -Wertes. Die Zeit bis zum Erreichen der terminalen Präzipitatsfläche ist u. a. vom Molekulargewicht des untersuchten Antigens und damit von seinem Diffusionskoeffizienten abhängig: die bis dahin verstrichene Diffusionszeit hängt auch von der Temperatur ab: eine höhere Temperatur bewirkt ein schnelleres Wandern der Antigenmoleküle.

Nach MANCINI ließ sich die Empfindlichkeit der einfachen radialen Immunodiffusion zu 10–20 $\mu\text{g/l}$ bestimmen. Die Gesetzmäßigkeiten der MANCINI-Modifikation treffen zum Teil auch für die FAHEY-Modifikation zu. Hier besteht eine lineare Beziehung zwischen dem zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Diffusion gemessenen Präzipitattendurchmesser und dem Logarithmus der Antigenkonzentration. Da jedoch unter Diffusion gemessen wird, können entsprechende Platten nach oft wesentlich kürzeren Diffusionszeiten abgelesen werden.

Vorbereitung und Beschickung der Platten

Zur Füllung der Antigenbehälter verwendeten wir eine Hamilton-Mikroliterspritze mit Dosiervorrichtung. Eingefüllt wurden genau 2 μl Standard- bzw. Analysenlösung in die Partigen- sowie 5 μl in die Tripartigen- bzw. M-Partigen-Platten und die vergleichsweise untersuchten Immuno-Plates der Fa. Hyland. Zur Herstellung einer Konversionsgeraden wurden 3–4 unterschiedliche Standardserum-Verdünnungen pro Platte benutzt. Nach dem Füllen der Antigen-Reservoirs mit Standard- bzw. Analysenlösung wurden die Platten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf einer horizontalen Ablage für 24 bzw. 48 h (z. B. höhermolekulare Antigene IgM, α_2 -Makroglobulin) aufbewahrt und im

Anschluß daran zur Präzipitatsmessung herangezogen. Bei den im Vergleich untersuchten Immuno-Plates betrugen die Diffusionszeiten 4 h bei 37°C für IgG, Transferrin und Albumin sowie 16 h bei Raumtemperatur für Coeruloplasmin, α_2 -Makroglobulin, β_{1A} -Globulin, IgA und IgM.

Konzentrationsbereiche

Die für die Serumproteinbestimmung auf Immunodiffusions-Platten brauchbaren Konzentrationsbereiche gehen aus Tabelle 1 hervor.

Auswertung

Für die Auswertung der Partigen- bzw. Tri- oder M-Partigen-Platten muß nach beendeter Diffusion die terminale Präzipitatsfläche oder das Quadrat des Durchmessers bestimmt werden. Wir bestimmen die exakte Präzipitationsfläche aus den gemessenen drei Teilstrecken des Durchmessers a , b , c und den darauf senkrecht stehenden Teilstrecken a' , b' und c' (Abb. 1). Diese Werte wurden in ein Auswerteformular zusammen mit den Konzentrationen der Standards und den Bezeichnungen der Analysen,

Tab. 1
Konzentrationsbereiche bei der linearen radialen Immunodiffusion in 10^{-2} g/l

Protein	Partigen-Platten	Immunoplates
Albumin	15–40	18–710
α_1 -Antitrypsin	10–40	
α_2 -Haptoglobin	10–60	
α_2 -Makroglobulin	15–80	65–390
Coeruloplasmin	5–20	9,5–55
Transferrin	15–40	80–440
β_{1A} -Globulin	5–40	60–360
IgG	10–40	280–2000
	10–120*	
IgA	10–40	60–400
	10–100*	
IgM	5–30	18–130
	10–100*	

* Tripartigen

Methode nach Mancini

Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\sum xy - N\bar{x}\bar{y}}{\sqrt{(\sum x^2 - N\bar{x}^2)(\sum y^2 - N\bar{y}^2)}} \\ -1 \leq r \leq 1$$

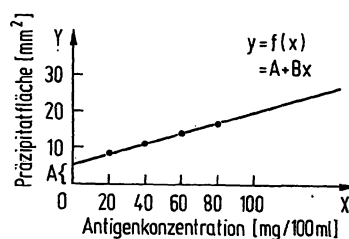
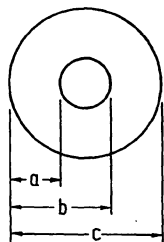
Standardgerade (lineare Regressionsgerade)

$$y = A + Bx \quad (y: \text{Präzipitatfläche in mm}^2 \\ x: \text{Konzentration in mg/100 ml})$$

$$A = \bar{y} - B\bar{x} \\ B = \frac{\sum xy - N\bar{x}\bar{y}}{\sum x^2 - N\bar{x}^2}$$

$$x = -\frac{A}{B} + \frac{1}{B}y$$

Konzentration Fläche



$$F = \pi r^2 = \frac{\pi}{4} d^2$$

d : innerer Durchmesser

D : äußerer Durchmesser

F_p : terminale Präzipitatfläche

$$F_p = F_{p0} - F_{pd} \\ = \frac{\pi}{4} (D^2 - d^2)$$

$$d = b - a \quad D = c$$

$$F_p = \left[\frac{\pi}{4} c^2 - (b-a)^2 \right]$$

$$\bar{F}_p = \frac{F_{p1} + F_{p2}}{2} = \frac{\sum_{i=1}^N F_{pi}}{N}$$

Methode nach Fahey

Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\sum xy - N\bar{x}\bar{y}}{\sqrt{(\sum x^2 - N\bar{x}^2)(\sum y^2 - N\bar{y}^2)}} \\ -1 \leq r \leq 1$$

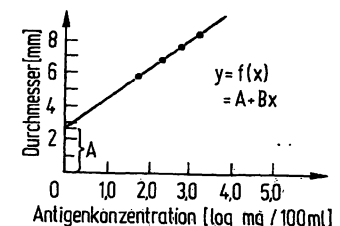
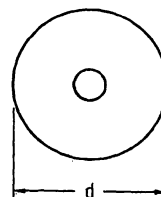
Standardgerade (lineare Regressionsgerade)

$$y = A + Bx \quad (y: \text{Präzipitattendurchmesser in mm} \\ x: \text{Logarithmus der Konzentration})$$

$$A = \bar{y} - B\bar{x} \\ B = \frac{\sum xy - N\bar{x}\bar{y}}{\sum x^2 - N\bar{x}^2}$$

$$x = -\frac{A}{B} + \frac{1}{B}y$$

log. Konzentration Durchmesser



1. Logarithmieren der Standard-Konzentrations-Werte

2. Berechnung der linearen Regressionsgeraden

3. Entlogarithmieren der logarithmierten Konzentrationswerte

Abb. 1
Quantitative immunologische Proteinbestimmung nach der einfachen radialen Immunodiffusion. Vorgehen bei der Berechnung nach der Auswertemethode von MANCINI bzw. FAHEY

QUANTITATIVE IMMUNOLOGISCHE PROTEINBESTIMMUNG

Nr.
1

(nach MANCINI)

PROGRAMMBEFEHLE

(INDIK)

PROGRAMMKARTE NR.

PROGRAMMKARTE NR.

REGISTER 1	REGISTER 2	REGISTER F
1 A V	25 C V	48 C +
2 /O	26 A N	50 C ↑
3 E *	27 E +	51 E/↑
4 B V	28 A/↑	52 E X
5 S	29 D/↑	53 D/↑
6 ↑	30 :	54 D/+
7 S	31 A O	55 D/↑
8 -	32 ↑	56 A :
9 A X	33 A Y	57 D +
10 E/↑	34 E ↑	58 D ↑
11 S	35 S	59 V
12 ↑	36 E/↑	60 A W
13 A X	37 ↑	61 C/↑
14 E/-	38 B/+	62 A X
15 A/↑	39 B/↑	63 D :
16 R +	40 E ↑	64 C ↑
17 R -	41 C/+	65 C -
18 R O	42 C/↑	66 C ↑
19 R :	43 E/↑	67 B/↑
20 D/S	44 A X	68 A X
21 X	45 B +	69 D :
22 A/O	46 B ↑	70 B ↑
23 E ↑	47 E ↑	71 R S
24 /V	48 A X	72 S

F_{P1}

F_{P2}

F_{P1}

Stand.-Konz. I

F_{P1}

Stand.-Konz. II

F_{P1}

Stand.-Konz. III

F_{P1}

Stand.-Konz. IV

a 1.08 S
b 3.25 S
c 4.25 S

10.487917 a0

a' 1.08 S

b' 3.25 S

c' 4.33 S

11.027016 a0

10.757466 A0

42.5 S

5.785531 Y

21.25 S

4.968479 Y

14.17 S

3.747064 Y

10.63 S

W

Konstanten auf der Karte		Konstanten auf der Karte	
	↑		↑
	↑		↑
	↑		↑

Zur Beachtung

4405

QUANTITATIVE IMMUNOLOGISCHE PROTEINBESTIMMUNG

Nr.
2

(nach MANCINI)

PROGRAMMBEFEHLE

PROGRAMMKARTE NR.

PROGRAMMKARTE NR.

REGISTER 1	REGISTER 2	REGISTER F	REGISTER E	
1 A V	25 D ↑	49 A :	73 R -	V
2 R S	26 F/-	50 :	74 R O	F
3 B -	27 C ↑	51 B/↑	75 R :	S y.x
4 B ↑	28 C :	52 D/*	76 D/S	A
5 B/↑	29 A V	53 B V	77 X	B
6 C/X	30 A/O	54 /O	78 A/O	Stand.-F _{P1}
7 D :	31 B/↑	55 D *	79 D ↑	Verd.Faktor
8 D/↑	32 D :	56 B W	80 /V	Konz.I
9 D/-	33 D/X	57 S	81 C W	Stand.-F _{P2}
10 D/↑	34 C/↑	58 ↑	82 A/V	Konz.II
11 B ↑	35 D :	59 W	83 D +	Stand.-F _{P3}
12 C X	36 C/-	60 S	84 F/:	Konz.III
13 A V	37 /O	61 R/↑	85 A O	Stand.-F _{P4}
14 ↑	38 A O	62 A W	86 ↑	Konz.IV
15 D/↑	39 D/↑	63 S	87 A Y	
16 :	40 B ↑	64 -	88 ↑	F _{P1}
17 A/O	41 B O	65 A X	89 B/X	
18 D/↑	42 /O	66 D/↑	90 B +	
19 B :	43 D/↑	67 S	91 S	
20 D/↑	44 B :	68 ↑	92 X	
21 D/X	45 A/↑	69 A X	93 R O	F _{P2}
22 C ↑	46 E/↑	70 D/-	94 C V	F _P
23 C -	47 X	71 A/↑	95	(Konz.
24 C ↑	48 B ↑	72 R +	96	Verd.Faktor
				End-Konz.

a 0.6 S
 b 2.64 S
 c 3.52 S
 5.70537 a 0
 a' 0.68 S
 b' 2.88 S
 c' 3.49 S
 5.764714 a 0
 5.777755 A 0
 19.636071 A 0
 93.190355 K 0

Konstanten auf der Karte	Konstanten auf der Karte
↑	↑
↑	↑
↑	↑

Zur Beachtung

4405

Abb. 2

Quantitative immunologische Proteinbestimmung nach der einfachen radialen Immunodiffusion. Berechnung nach der Auswertemethode von MANCINI. Rechenprogramm für Olivetti Tischcomputer P 101 mit einem Beispiel, a, b, c bzw. a', b', c' Teilstrecken des Präzipitatsdurchmessers; F_p-gemittelte Präzipitatsfläche, Stand. = Standard, Konzentration in 10⁻¹ g/l

Chargen-Nr. und Patientenserum-Verdünnungsfaktoren eingetragen.

Für die Auswertung der Immuno-Plates nach dem FAHEYschen Verfahren werden lediglich zwei, einfache senkrecht aufeinanderstehende Durchmesser der Präzipitatsringe zu den festgesetzten Zeitpunkten gemessen.

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Leitz-Meßkomparators und eines von uns entwickelten Dunkelfeldadapters durchgeführt.

Üblicherweise trägt man die zusammengehörigen Wertepaare: Präzipitatsflächenwert oder Quadrat des Durchmessers mit zugehöriger Standard-Konzentration (Partigen-Platten) bzw. Durchmesser und zugehörigen Logarithmus der Standard-Antigenkonzentration (Immuno-Plates) auf linearem mm-Papier auf. Nach der FAHEY-Methode kann man auch die Antigenkonzentration auf dem logarithmischen Schenkel und den Durchmesser auf dem linearen Schenkel eines semilogarithmischen mm-Papiers auftragen. Anschließend legt man durch die erhaltenen Punkte eine „von Auge“ angepaßte Gerade. An dieser Bezugsgeraden werden dann die Konzentrationen der untersuchten Analysenlösungen innerhalb der niedrigsten und höchsten Standard-Punkte abgelesen.

Rechnerisches Verfahren

Die mehr oder weniger subjektive Anpassung an die Standardpunkte läßt sich aber durch Ermittlung einer linearen Regressionsgeraden für diese Punkte nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate besser durchführen.

Sämtliche statistischen Auswertungen (t-Test für Paardifferenzen, χ^2 -Vierfeldertest, Mittelwert, Standard-Abweichung, Variationskoeffizient, lineare Regressionsgerade, Korrelationskoeffizient (5)) sowie die Berechnung der Serumkonzentration wurden an einem Olivetti Tischcomputer Programma P 101 mit zumeist eigenen Programmen durchgeführt. Das von uns für die Partigen- bzw. Tripartigen-Platten entwickelte Auswertprogramm (Abb. 2) führt folgende Rechenoperationen durch:

Pro Präzipitat werden 2 Flächenwerte nach der in Abbildung 1 wiedergegebenen Formel aus den gemessenen Werten a, b, c bzw. a', b' und c' berechnet, gemittelt und zusammen mit den zugehörigen drei bis vier Standard-Konzentrationswerten zur Berechnung der Regressionsgeraden verwandt. Die Kennwerte der Regressionsgleichung

$$y = A \text{ (Ordinatenabschnitt)} + B \text{ (Steigung der Geraden)} \cdot x$$

werden daraufhin errechnet und zur weiteren Bestimmung von Ordinatenbeispielen gespeichert. Als zusätzliche Kenngrößen werden noch der lineare Korrelationskoeffizient r und der $s_y \cdot x$ -Wert (Standardfehler der y-Schätzung) ausgedruckt.

In der Abbildung 2 ist auch ein Rechenbeispiel wiedergegeben. Daraus geht hervor, daß im Anschluß an den unbedingten Sprungbefehl „V“ nach Eingabe der gemessenen Teilstrecken eines Standard-Präzipitates jeweils der berechnete Flächenwert und nach zwei Flächenwerten eines Standard-Präzipitates der zugehörige Mittelwert automatisch ausgedruckt wird. Nach Eingabe der zugehörigen Standardkonzentrationen wiederholt sich das Rechenschema für die Standards II bis III bzw. IV. Die Standardwerte können auch getrennt direkt mit dem entsprechenden gemittelten Präzipitatsflächenwert eingegeben werden. Schließlich wird das Programm mit dem unbedingten Sprungbefehl „W“ unterbrochen und die zweite Programmkartenhälfte ohne Löschung eingegeben. Ein neuer Sprungbefehl „V“ führt zu Berechnung und Ausdruck des Korrelationskoeffizienten r, des $s_y \cdot x$ -Wertes sowie der Kennwerte für die lineare Regressionsgleichung A und B. Nun werden nach der berechneten Regressionsgleichung unter Eingabe der zuvor gemittelten Präzipitatsflächen der Standards die zugehörigen Konzentrationen als Ordinatenbeispiele der linearen Regressionsgleichung berechnet und mit den vorgegebenen Ausgangskonzentrationen der Standards verglichen. Erst dann wird entschieden, ob die berechnete Regressionsgleichung akzeptabel ist. Nun werden die Präzipitatsflächen und -konzentrationen der Patientenserum (Analysenlösungen) berechnet. Vor dem endgültigen Ausdruck der Konzentrationen können durch Eingabe des zugehörigen Verdünnungsfaktors diese noch entsprechend

multipliziert werden. Insgesamt dauert die Auswertung einer einzigen Partigen-Platte 3–5 min und liefert am Schluß einen übersichtlich angeordneten Rechenstreifen, der zusammen mit dem Auswertformular dokumentationsgerecht abgeheftet werden kann.

Im Prinzip wurde bei der Auswertung der Immuno-Plates nach der FAHEY-Methode ähnlich verfahren. Mit von uns entwickelten Rechenprogrammen werden zunächst die Standard-Konzentrationen logarithmiert, und dann zusammen mit zwei aufeinander senkrecht stehenden gemessenen Durchmessern der zugehörigen Präzipitate in das Auswertprogramm eingegeben. Daraufhin erfolgt die Berechnung der linearen Regressionsgeraden y (Durchmesser) = $A + B \cdot x$ (logarithmierte Antigen-Konzentration) und des zugehörigen Korrelationskoeffizienten. Die dann berechneten Logarithmen der Analysen-Antigen-Konzentrationen werden automatisch entlogarithmiert und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor als Endkonzentration ausgedruckt.

Ergebnisse und Diskussion

Präzision der Methode auf Partigen-Platten

Messung

Beim Vergleich der Messungen zwischen Meß-Mikroskop, -Lupe und -Schablone im t-Test für Paardifferenzen konnten signifikante Meßwertunterschiede gefunden werden. Sie waren für die Quadrate der bestimmten Durchmesser deutlicher als bei Berücksichtigung der errechneten Konzentrationen. In einer weiteren Versuchsanordnung wurde die individuelle Meßstreuung bei der Auswertung einer Partigen-Platte von 5 Versuchspersonen untersucht. Die Variationskoeffizienten schwankten bei Bestimmung des Durchmesserquadrats zwischen 1,4 und 4,4%, bei Berücksichtigung der anhand der jeweiligen Regressionsgeraden bestimmten Konzentrationen jedoch nur zwischen 0,3 und 2,1%.

Regressionsgerade

Ein Maß für die Genauigkeit, mit der die zur Auswertung verwandten Standardpunkte um die Regressionsgerade streuen, ist die Größe des Korrelationskoeffizienten r. Er sollte mindestens einen Wert von $> 0,95$, besser aber von $> 0,98$ betragen. Als weiterer Parameter zur Beurteilung der Regressionsgeraden beachten wir neben dem $s_y \cdot x$ -Wert den Grad der Konzentrationsabweichung vom vorgegebenen Standardwert, wenn man die nicht an die Regressionsgerade angepaßten gemessenen Flächenwerte der Standardpunkte zur Konzentrationsberechnung verwendet. Je größer der Wert von r, desto geringer ist die Abweichung vom erwarteten Konzentrationswert.

Vergleich der Regressionsgeraden mehrerer Partigen-Platten

Es wurde untersucht, ob die für eine Partigen-Platte berechnete Regressionsgerade auch für andere Platten des gleichen Proteins verwendbar ist. Dazu wurden die Eichgeraden für 10 Serumproteine von insgesamt 881 einfachen 20 M- und 152 Tri-Partigen-Platten mit einem Korrelationskoeffizienten über 0,95 auf die Streuung ihrer Kennwerte A (Ordinatenabschnitt) und B (Steigung) verglichen.

Es ließ sich zeigen, daß die Streuung um den Mittelwert von A extrem hoch liegt, während sie für die Steigung B deutlich geringer, aber ausgeprägt bestand (Vari-

Tab. 2

Vergleich von 5 Auswertungsverfahren der einfachen radialen Immunodiffusion nach MANCINI. Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient ($V\%$) von Mehrfachbestimmungen bei Auswertung derselben Partigenplatte nach Verfahren a, b, c, d und e (siehe Text).
* signifikante Unterschiede der Varianzen (s^2) zur Varianz der Methode e. Konzentration in 10^{-3} g/l

Protein		a	b	c	d	e
IgG n = 6	\bar{x}	1449,3	1559,7	1490,5	1502,3	1514,1
	s	101,2*	51,8	86,0	59,1	39,8
	$V\%$	7,0%	3,3%	5,8%	3,9%	2,6%
IgA n = 6	\bar{x}	232,6	255,7	254,1	252,0	246,9
	s	22,0*	11,1*	9,4*	4,7	3,9
	$V\%$	9,5%	4,4%	3,7%	1,9%	1,6%
IgM n = 5	\bar{x}	119,5	120,8	125,7	125,1	117,2
	s	5,1	4,9	5,2	4,5	4,1
	$V\%$	4,3%	4,0%	4,1%	3,6%	3,4%
Albumin n = 4	\bar{x}	2309,3	2421,3	2389,3	2373,9	2375,8
	s	72,9	37,5	34,1	33,9	30,0
	$V\%$	3,2%	1,6%	1,4%	1,4%	1,2%
Coeruloplasmin n = 6	\bar{x}	43,5	40,6	40,5	40,1	39,2
	s	5,5*	1,5	1,5	1,1	1,1
	$V\%$	12,6%	3,6%	3,6%	2,8%	2,8%
Transferrin n = 6	\bar{x}	206,9	221,7	229,5	228,2	225,6
	s	12,6	12,9	16,5	16,6	17,5
	$V\%$	6,1%	5,8%	7,2%	7,3%	7,8%
β_1 A-Globulin n = 8	\bar{x}	128,9	125,1	125,3	117,0	114,3
	s	11,8*	8,7*	5,4*	3,6*	1,7
	$V\%$	9,2%	6,9%	4,3%	3,1%	1,4%

ationskoeffizient V zwischen 9,6 und 75%). Berücksichtigt man nur die Platten gleicher Charge, (9 Serumproteine, insgesamt 16 Chargen) ändert sich das Ausmaß der Streuung der A-Werte kaum, während die Streuung der Steigungen B deutlich abnimmt (V zwischen 6,3 und 24,8%). Aus diesen Untersuchungen folgt, daß für jede einzelne Partigen-Platte eine eigene Regressionsgerade ermittelt werden muß.

Vergleich verschiedener Auswerteverfahren

Fünf unterschiedliche Auswerteverfahren wurden miteinander verglichen (Tab. 2):

- Messung des Durchmessers mit Meß-Schablone und grafische Auswertung
- Messung des Durchmessers mit Meß-Mikroskop und grafische Auswertung
- Messung des Durchmessers mit Meß-Mikroskop und Konzentrationsberechnung mit Computer (y : Durchmesser)
- Messung des Durchmessers mit Meß-Mikroskop und Konzentrationsberechnung mit Computer (y : Quadrat des Durchmessers)
- Messung des Durchmessers mit Meß-Mikroskop und Konzentrationsberechnung mit Computer nach dem eigenen Verfahren (y : Präzipitatsfläche).

Nach Tabelle 2 nimmt bei Vergleich von Mehrfachbestimmungen die Streuung bzw. der Variationskoeffizient von a nach e in der Regel ab. Die Zahlen mit Sternchen weisen auf einen signifikanten Unterschied zur Methode e hin.

Eigenes Auswerteverfahren

Zur Bestimmung der Präzision der Methode bei Anwendung des eigenen Auswerteverfahrens wurden die Konzentrationen aus Mehrfachbestimmungen von Stan-

dardserum-Verdünnungen für 10 Serumproteine in 3–4 Konzentrationen von 470 Partigen-Platten (312 einfachen, 138 Tri-, 20 M-Partigen) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98 und größer miteinander verglichen (Tab. 3). Dabei zeigte sich, daß die Streuung der Mittelwerte mit zunehmender Verdünnung ansteigt. Die Gesamt-Variationskoeffizienten aller Standardserum-Verdünnungen nach Rückrechnung auf die Ausgangskonzentration schwankten für die untersuchten Proteine zwischen 2,4% (Transferrin) und 7,1% (IgG). Die berechneten Mittelwerte selbst weichen kaum von den erwarteten Werten ab.

Auswertung auf Tripartigenplatten

Die seit einiger Zeit im Handel befindlichen Tripartigen-Platten verfügen über einen größeren Antikörpergehalt und erlauben die Einfüllung größerer Volumina (5 μ l). Nach Angabe der Hersteller sollen sie für normale IgA- und IgM-Spiegel mit unverdünntem sowie für normale IgG-Spiegel mit 1:10 verdünntem Serum beschickt werden können.

Ein wichtiger Vorteil für Routine-Untersuchungen ist, daß laut Angabe der Hersteller auf die Erstellung einer Eichgeraden verzichtet werden kann, da wegen des standardisierten Antikörpergehalts sowie präziser Reproduzierbarkeit von Antigen-Reservoir und Schichtdicke anhand einer mitgegebenen Konversionstabelle direkt von jedem beliebigen Durchmesserquadrat des Präzipitats auf die zugehörige Konzentration geschlossen werden kann. Die Überprüfung der Brauchbarkeit der einzelnen Platten ist heute durch Verwendung von Präzisions- und Richtigkeitskontrollseren möglich. Für besonders exakte Bestimmungen sind aber auch für die Tripartigen-Platten Standard-Immunglobuline für je drei verschiedene Konzentrationen erhältlich.

Tab. 3

Präzision der einfachen radialen Immunodiffusion nach MANCINI auf Partigenplatten (Fa. Behringwerke) aus Mehrfachbestimmungen von Standardprotein-Lösungen in 3—4 Konzentrationen. Unter unv. wurden die Konzentrationen sämtlicher Standardverdünnungen auf die unverdünnte Ausgangskonzentration zurückgerechnet und gemittelt. (Ausnahme: *Tripartigen-IgG-IgA, -IgM und Haptoglobin-M-Partigen). Mittelwert \bar{x} , Standardabweichung s , Variations-Koeffizient V . Konzentrationen in 10^{-2} g/l

Protein	N	Verdünnung	Erwarteter Wert	Gefunden \bar{x}	s	V [%]
IgG	128	unv.	645	641,8	45,35	7,1
	34	1:20	32,3	32,2	0,63	1,9
	34	1:30	21,5	21,8	1,45	6,7
	26	1:40	16,1	16,0	1,22	7,6
	34	1:50	12,9	12,6	1,24	9,8
IgA	104	unv.	115	115,2	4,77	4,1
	26	1:3	38,3	38,5	0,46	1,2
	26	1:5	23	22,6	1,17	5,2
	26	1:8	14,4	14,6	0,58	4,0
	26	1:10	11,5	11,6	0,52	4,5
IgM	129	unv.	60	59,7	3,87	6,5
	34	1:2	30	29,8	0,29	1,0
	34	1:4	15	15,6	0,92	5,9
	27	1:6	10	10,1	0,42	4,2
	34	1:8	7,5	7,1	0,56	7,9
Albumin	30	unv.	2670	2670,7	107,1	4,0
	10	1:80	33,4	33,1	0,81	2,5
	10	1:100	26,7	27,6	1,15	4,2
	10	1:150	17,8	17,4	0,51	2,9
α_2 -Haptoglobin	147	unv.	175	174,3	7,66	4,4
	38	1:3	58,3	58,4	0,73	1,2
	36	1:5	35	34,9	1,60	4,6
	36	1:10	17,5	17,5	0,85	4,8
	36	1:15	11,6	11,5	0,66	5,7
α_2 -Haptoglobin*	20	unv.	266	266,2	0,88	0,3
	20	unv.	136	135,6	2,51	1,9
	20	unv.	68	68,3	1,65	2,4
	99	unv.	1290	1292,2	44,52	3,4
IgG*	36	1:10	129	129,4	1,13	0,9
	20	1:15	86	85,1	2,47	2,9
	27	1:20	64,5	64,3	2,51	3,9
	16	1:40	32,3	33,1	1,78	5,4
	136	unv.	22	22,0	0,97	4,4
Coeruloplasmin	35	unv.	22	22,0	0,15	0,7
	31	1:2	11	11,2	0,49	4,4
	35	1:3	7,5	7,3	0,30	4,1
	35	1:4	5,5	5,4	0,34	6,3
	62	unv.	160	160	4,69	2,9
α_1 -Antitrypsin	17	1:4	40	40,1	0,35	0,9
	17	1:6	26,6	26,3	0,89	3,4
	15	1:8	20	20,1	0,65	3,2
	13	1:10	16	16,2	0,54	3,3
	19	1:8	15,6	15,9	0,90	5,7
α_2 -Makroglobulin	90	unv.	265	264,7	6,37	2,4
	22	1:8	33,1	33,1	0,26	0,8
	23	1:10	26,5	26,8	0,63	2,3
	21	1:12	22,1	21,6	0,61	2,8
	24	1:15	17,6	17,8	0,39	2,2
β_{1A} -Globulin	280	unv.	75	74,7	4,78	6,4
	73	1:2	37,5	37,4	0,21	0,6
	72	1:5	15	15,4	0,61	4,0
	71	1:8	9,4	9,6	0,61	6,4
	64	1:10	7,5	7,0	0,56	8,0
IgA*	51	unv.	322	325,8	2,13	0,7
	51	unv.	173	164,0	5,08	3,1
IgM*	49	unv.	68	73,3	2,97	4,1
	51	unv.	258	259,2	2,22	0,9
	50	unv.	135	132,2	5,33	4,0
	51	unv.	46	47,6	3,06	6,4

Wir untersuchten 4 IgG-, IgA- und IgM-Tripartigen-Platten mit einer Standard-Protein-Verdünnungsreihe und verglichen die berechneten Regressionsgeraden mit den Geradengleichungen der vorgegebenen Eichkurven

bzw. -tabellen. Ein Beispiel der grafischen Darstellung der Auswertung einer IgG-Tripartigen-Platte zeigt Abbildung 3. Für IgG und IgM ließ sich eine gute Übereinstimmung unserer Regressionsgleichungen mit

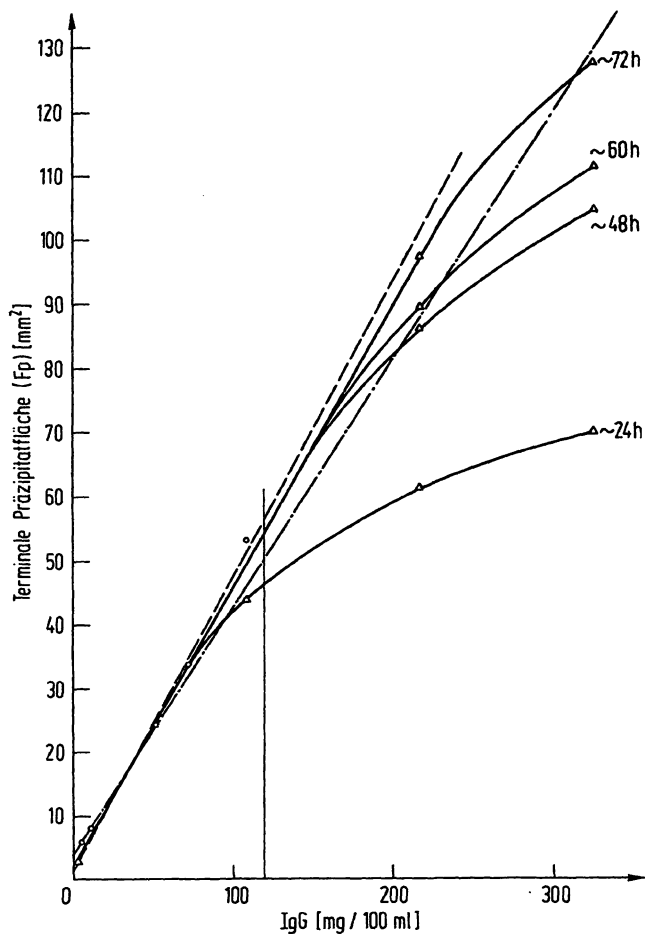


Abb. 3

Grafische Darstellung der Standardgeraden einer IgG-Tripartigenplatte (OP-Nr. 886, Fa. Behringwerke). Bestimmung der Präzipitationsflächen verschiedener Standardserum-Verdünnungen in Abhängigkeit von der Diffusionszeit.

Vorgegebene Regressionsgerade (---) $y = 3,90 + 0,389 x$
 Berechnete Regressionsgerade (- - -) $y = 2,16 + 0,463 x$;
 $r = 0,997$

Senkrechte Linie = Bereich der Übereinstimmung der Regressionsgleichungen

den vorgegebenen in einem Konzentrationsbereich von 10–120 mg/100 ml (IgG) und 10–100 mg/100 ml (IgM) feststellen. Für IgA zeigten die 4 untersuchten Platten eine stärkere Streuung der Steigungen B.

Wir bestimmten auf 50 IgG-, 51 IgA- und 51 IgM-Tripartigen-Platten eigene Regressionsgeraden mit einem Standard-Humanserum (IgG) bzw. einem Dreifach-Tripartigen-Standard (Standard Immunglobulin für IgA- bzw. IgM-Standard). Dabei lagen die Variationskoeffizienten der A-Werte zwischen 30 und 70%, die der B-Werte (Steigung) zwischen 9,6 und 21,1%. Unter Berücksichtigung der Platten gleicher Charge (N zwischen 21 und 26) zeigte sich keine wesentliche Änderung der Streuung beider Parameter. Aufgrund der Untersuchungen empfiehlt es sich, auch für Tripartigen-Platten Immunglobulin-Standards zur Herstellung einer Eichgeraden zu verwenden, wenn es auf größere Genauigkeit ankommt. Die Präzision der Methode für Tripartigen-Platten geht aus Tabelle 3 hervor. Danach beträgt die Gesamt-Streuung für die untersuchten IgG-Tripartigen-Platten 3,4% (V), für die IgA-Platten steigt sie bis 4,1%, für IgM bis 6,4% an.

Auswertung auf M-Partigen-Platten

In Anlehnung an die Tripartigen-Platten sind seit kurzem M-Partigen-Platten auch für die übrigen Serumproteine im Handel. Als Beispiel untersuchten wir ein Kollektiv von 20 Haptoglobin-M-Partigen-Platten und fanden besonders niedrige Variationskoeffizienten des A- (24,6%) und B-Wertes (8,5%) sowie für die Dreifach-Standards (Tab. 3, zwischen 0,3 und 2,4%).

Auswertung auf Immuno-Plates

Wir konnten feststellen, daß das von uns entwickelte Auswerteprogramm sich auch hervorragend zur Auswertung von Immunodiffusionsplatten (Immuno-Plate) eignet. Ein Beispiel für die grafische Darstellung der aus den Regressionsgeraden von 3–4 Platten ermittelten Gesamt-Regressionsgeraden für die Immunglobuline IgG, IgA und IgM zeigt Abbildung 4. Wir untersuchten auf je 2–6 Immunoplates für 8 verschiedene Serumproteine die Standardseren der Fa. Hyland und Fa. Behringwerke (Standard-Humanserum stabilisiert) und bestimmten für jede Platte die aufgrund der Hyland- bzw. Behringwerke-Standardkonzentration ermittelte Standard-Regressionsgerade. Mittelwert, Streuung und Variationskoeffizient der A- und B-Werte sowie die Gleichung der Gesamt-Regressionsgerade mit Korrelations-Koeffizient und Streuung $s_{y,x}$ gehen aus Tabelle 4 hervor. Außerdem sind in der letzten Spalte noch die Maximal-Abweichungen der aufgrund der Standard-Regressionsgeraden ermittelten untersuchten Standard-Konzentrationen von den angegebenen Konzentrationswerten aufgeführt. Der Tabelle ist zu entnehmen, daß die Streuungen der A-Werte (Ordinatenabschnitt) oft sehr groß sind und zwischen 3,7% und 121% (VK) schwanken, während die Variationskoeffizienten der B-Werte (Steigung) nur

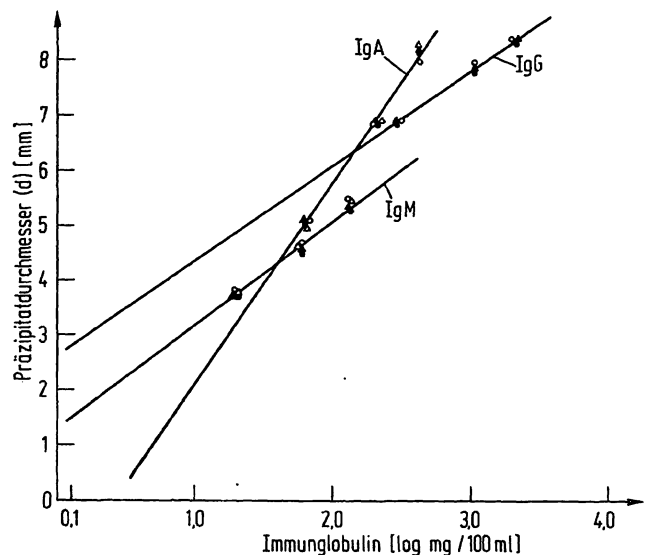


Abb. 4

Grafische Darstellung der Gesamt-Standardgeraden (lineare Gesamt-Regressionsgerade) für je 4 bzw. 3 Immunoplates (I = ●, II = ▲, III = ○, IV = △) zur Bestimmung der Immunglobuline IgM, IgA und IgG

Auswertung nach der Methode von FAHEY

IgA: $y = 3,7 x - 1,5$; $s_{yx} = 0,104$ $r = 0,997$ ($n = 4$)
 IgG: $y = 1,7 x + 2,7$; $s_{yx} = 0,051$ $r = 0,997$ ($n = 3$)
 IgM: $y = 1,9 x + 1,4$; $s_{yx} = 0,109$ $r = 0,988$ ($n = 4$)

Tab. 4

Quantitative Proteinbestimmung auf Immunoplates (Fa. Hyland) nach der Methode von FAHEY für 8 Serumproteine. Zusammenstellung von Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der Kennwerte für die Einzelgeraden $y = B \cdot x$ (Log. der Konzentration) + A. Angabe der linearen Gesamt-Regressionsgeraden, ihrer Korrelationskoeffizienten und Streuungen $s_{y \cdot x}$. Ermittlung der Regressionsgeraden unter Verwendung von Standards der Fa. Hyland und Fa. Behring (Standard-Humanserum stabilisiert). Angabe der Schwankungsbreite der prozentualen Abweichung der jeweils ermittelten Konzentrationen der untersuchten Standards vom vorgegebenen Wert. B. = Behring, H. = Hyland. Konzentrationen in 10^{-2} g/l

Protein	Lineare Regressionsgerade $A \pm s$	$y(d) = Bx(\log c) + A$ (VK) $B \pm s$	Anzahl Platten	Standard	Gesamt- Regressionsgerade	r	$s_{y \cdot x}$	Verwendeter Standard	Maximal- Abweichung der untersuchten Standards
Albumin	$1,26 \pm 0,13$ $2,41 \pm 0,21$	(10,7%) (8,7%)	4	4	$y = 2,43x + 1,26$ $y = 1,97x + 2,31$	0,9902 0,9927	0,137 0,133	Hyland -9% Behring -49%	+57% B. +17% H.
Coeruloplasmin	$1,87 \pm 0,20$ $2,31 \pm 0,25$	(10,5%) (10,8%)	6	3	$y = 2,44x + 1,88$ $y = 2,27x + 2,31$	0,9788 0,9897	0,169 0,071	Hyland +12% Behring -17%	+40% B. -26% H.
α_2 -Makroglobulin	$2,31 \pm 0,25$ $-0,75 \pm 0,07$	(10,8%) (9,4%)	4	3	$y = 3,07x - 0,75$ $y = 2,91x - 0,23$	0,9968 0,9944	0,083 0,065	Hyland +13% Behring -6%	+19% B. -15% H.
β_{1A} -Globulin	$-0,23 \pm 0,26$ $-1,88 \pm 0,15$	(113%) (8%)	5	3	$y = 3,57x - 1,88$ $y = 3,04x - 0,19$	0,9926 0,9930	0,148 0,075	Hyland +59% Behring -15%	+90% B. -40% H.
Transferrin	$-0,19 \pm 0,23$ $1,25 \pm 0,24$	(121%) (19,4%)	6	3	$y = 2,47x + 1,25$ $y = 2,75x + 0,70$	0,9922 0,9861	0,101 0,097	Hyland +1% Behring -16%	+14% B. +4% H.
IgG	$0,70 \pm 0,25$ $2,47 \pm 0,09$	(35,1%) (3,7%)	6	3	$y = 1,49x + 3,16$ $y = 1,82x + 2,29$	0,9909 0,9873	0,099 0,072	Hyland +13% Behring -10%	+90% B. -9% B.
IgA	$2,29 \pm 0,15$ $-2,04 \pm 0,10$	(6,6%) (5%)	3	3	$y = 3,75x - 2,04$ $y = 3,82x - 2,24$	0,9959 0,9953	0,119 0,080	Hyland -2% Behring -2%	+12% H. -57% B.
IgM	$-2,24 \pm 0,25$ $1,68 \pm 0,22$	(11,1%) (13%)	4	3	$y = 1,59x + 1,68$ $y = 1,78x + 0,81$	0,9921 0,9861	0,075 0,063	Hyland -48% Behring +72%	+136% H.

zwischen 1,5% und 8,9% streuen. Die aus bis zu 6 Einzelgeraden ermittelten Gesamtregressionsgeraden wiesen eine sehr gute Korrelation (0,9788—0,9968) und relativ kleine Streuungen auf ($s_{y \cdot x}$ zwischen 0,063 und 0,169).

Vergleich zwischen Behring- und Hyland-Standards

a) Bestimmung auf Immuno-Plates

Wie aus der letzten Spalte der Tabelle 4 hervorgeht, konnten bei der Bestimmung der Standards eines Herstellers unter Verwendung der Standards des anderen Herstellers als Standardserum beträchtliche Abweichungen vom Nennwert festgestellt werden. Die Extremabweichungen von den vorgegebenen Konzentrationen der untersuchten Standards waren am stärksten ausgeprägt bei Albumin, β_{1A} -Globulin, IgM, während sie am geringsten bei α_2 -Makroglobulin, Transferrin, IgG und IgA ausfielen.

b) Bestimmung auf Partigen-Platten

In einer weiteren Untersuchung wurden die Hyland-Standardkonzentrationen der einzelnen Proteine auf entsprechenden Partigen-Platten der Fa. Behringwerke bestimmt. Als Standard-Konzentration zur Bestimmung der Standard-Konzentrationsgeraden diente Standard-Humanserum stabilisiert der gleichen Firma (Tab. 5). Wie die Tabelle zeigt, sind die Abweichungen der bestimmten Konzentrationen von dem vorgegebenen Hyland-Standard für Albumin stark wechselsinnig schwankend, für IgM am stärksten positiv (über +50%), für Coeruloplasmin und β_{1A} -Globulin etwa gleichermaßen stark negativ (um -35%), für IgA weniger ausgeprägt negativ, während sie für Transferrin, α_2 -Makroglobulin und IgG am geringsten sind (um $\pm 15\%$).

Aus dieser Zusammenstellung ist zu entnehmen, daß man die mit den beiden Plattentypen bestimmten Serumproteinkonzentrationen nicht ohne weiteres miteinander vergleichen kann. Die gefundenen Unterschiede beruhen aufgrund unserer Untersuchungen nicht auf methodischen Fehlern, sondern sind einwandfrei auf die nicht vergleichbaren Konzentrationsangaben für die Standards beider Herstellerfirmen zurückzuführen.

Transformationen

Wir haben deshalb untersucht, ob sich aufgrund der vergleichenden Untersuchungen für beide Immuno-diffusionsplattentypen und die verschiedenen Standards eine lineare Beziehung zwischen den jeweils bestimmten Standard-Konzentrationen (gefundener Wert = y) und den angegebenen Konzentrations-Werten (Soll-Wert = x) herstellen läßt. Eine solche Beziehung müßte sinngemäß auch auf Analysen-Lösungen übertragbar sein. Die so erhaltenen linearen Regressionsgeraden-Gleichungen sind zusammen mit den zugehörigen Korrelations-Koeffizienten und Streuungen $s_{y \cdot x}$ sowie unter Angabe der Anzahl der benutzten

Tab. 5

Konzentrationsbestimmung der Standards von Immunoplates (Fa. Hyland) auf Partigenplatten (Fa. Behringwerke) unter Verwendung von Standards der Fa. Behringwerke (Standard-Humanserum stabilisiert) aus Mehrfachbestimmungen (Anzahl N). Zusammenstellung der jeweiligen angegebenen Konzentrationen der Standards der Fa. Hyland sowie der bestimmten gemittelten Konzentration (\bar{x}) mit Standard-Abweichung (s) und Variationskoeffizienten (VK), ferner Angabe der Abweichung der bestimmten gemittelten Konzentrationswerte von den angegebenen Konzentrationen. Konzentrationen in 10^{-3} g/l. *gleiche Untersuchungen mit einem Richtigkeits-Kontrollserum der Fa. Behringwerke

Protein	Bezugsgröße	Standard I	Standard II	Standard III	Standard IV
Albumin	Standard/Abweichung	(18)—25,4 %	(65)+8,6 %	(285)+41,4 %	(710)+54,2 %
	$\bar{x} \pm s$	13,4 \pm 0,38	70,6 \pm 0,73	402,9 \pm 0,78	1095,2 \pm 18,87
	n / VK	2 / 2,8 %	2 / 1,0 %	2 / 0,2 %	2 / 1,7 %
Coeruloplasmin	Standard/Abweichung	(9,5)—37,2 %	(24)—31,2 %		
	$\bar{x} \pm s$	6,0 \pm 0,02	16,5 \pm 1,21		
	n / VK	2 / 0,3 %	2 / 7,3 %		
α_2 -Makroglobulin	Standard/Abweichung	(65)—15,6 %	(190)—2,0 %	(390)—1,7 %	
	$\bar{x} \pm s$	54,9 \pm 0,55	186,2 \pm 0,80	383,5 \pm 2,71	
	n / VK	3 / 1,0 %	2 / 0,4 %	3 / 0,7 %	
β_{1A} -Globulin	Standard/Abweichung	(60)—38,9 %	(185)—37,4 %	(360)—39,1 %	
	$\bar{x} \pm s$	36,6 \pm 0,36	115,9 \pm 0,12	219,4 \pm 7,03	
	n / VK	3 / 1,0 %	2 / 0,1 %	3 / 3,2 %	
Transferrin	Standard/Abweichung	(80)+2,5 %	(240)—7,2 %	(440)+13,9 %	
	$\bar{x} \pm s$	82,0 \pm 1,08	222,8 \pm 2,90	500,9 \pm 3,16	
	n / VK	3 / 1,3 %	2 / 1,3 %	3 / 0,6 %	
IgG	Standard/Abweichung	(280)+6 %	(1000)—4,7 %	(2000)—12,3 %	(1250)*—3,7 %
	$\bar{x} \pm s$	296,7 \pm 1,7	953,0 \pm 22,4	1753,6 \pm 17,7	1204,1 \pm 54,5
	n / VK	2 / 0,6 %	2 / 2,4 %	2 / 1 %	2 / 4,5 %
IgA	Standard/Abweichung	(60)—4,8 %	(200)—19,6 %	(400)—22,2 %	(285)*+3,4 %
	$\bar{x} \pm s$	57,1 \pm 0,41	160,9 \pm 1,08	311,3 \pm 2,10	294,6 \pm 9,9
	n / VK	2 / 0,7 %	2 / 0,7 %	2 / 0,7 %	2 / 3,4 %
IgM	Standard/Abweichung	(18)+85,5 %	(58)+76,1 %	(130)+51,7 %	(115)*—6,2 %
	$\bar{x} \pm s$	33,4 \pm 0,48	102,1 \pm 2,09	197,2 \pm 1,15	107,9
	n / VK	2 / 1,4 %	2 / 2,1 %	2 / 0,6 %	1

Tab. 6

Transformation zwischen Standard-Konzentrationen der Fa. Behring (Partigenplatten, Standard-Humanserum stabilisiert) und der Fa. Hyland (Immunoplates) bei der einfachen radialen Immunodiffusion. Beispiel: Albumin-Hyland-Standard mit Konzentrationswert $1000 \cdot 10^{-3}$ g/l läßt im Mittel auf einer Partigenplatte unter Verwendung des Behring-Standards einen Wert (erwarteter = gefundener Wert) von $y = 1,57 \cdot 1000 - 28,38$ (10^{-3} g/l) erwarten. \bar{P} gemittelter Koordinatenpunkt (x, y) zur Ermittlung der linearen Regressionsgeraden

Verwendete Platten und Standards	Albumin	α_2 -Makroglobulin	Transferrin	β_{1A} -Globulin
Partigen-Platten	$y = 1,57x - 28,38$	$y = 1,01x - 8,70$	$y = 1,17x - 28,61$	$y = 0,61x + 1,36$
Standard Behring	$r = 0,9996$ (3 \bar{P} .)	$r = 0,9998$ (3 \bar{P} .)	$r = 0,9924$ (3 \bar{P} .)	$r = 0,9998$ (3 \bar{P} .)
y: Gefunden für Hyland	$s_{yx} = 17,218$	$s_{yx} = 4,051$	$s_{yx} = 37,174$	$s_{yx} = 2,526$
x: Sollwert Hyland				
Immunoplates	$y = 0,87x + 32,68$	$y = 1,10x + 4,43$	$y = 1,21x - 20,53$	$y = 1,46x + 9,63$
Standard Hyland	$r = 0,9999$ (4 \bar{P} .)	$r = 0,9999$ (3 \bar{P} .)	$r = 0,9998$	$r = 0,9982$
y: Gefunden für Behring	$s_{yx} = 5,217$	$s_{yx} = 1,104$	$s_{yx} = 3,277$	$s_{yx} = 3,440$
x: Sollwert Behring				
Verwendete Platten und Standards	IgG	IgA	IgM	Coeruloplasmin
Partigen-Platten	$y = 0,90x + 48,52$	$y = 0,72x + 6,86$	$y = 1,45x + 11,63$	
Standard Hyland	$r = 0,9965$ (6 \bar{P} .)	$r = 0,9930$ (6 \bar{P} .)	$r = 0,9975$ (3 \bar{P} .)	
y: Gefunden für Behring	$s_{yx} = 66,285$	$s_{yx} = 14,903$	$s_{yx} = 8,225$	
x: Sollwert Hyland				
Immunoplates		$y = 0,96x - 4,0$	$y = 0,57x - 7,10$	$y = 0,96x + 3,83$
Standard Hyland		$r = 0,9994$ (3 \bar{P} .)	$r = 0,9963$ (3 \bar{P} .)	$r = 0,9948$ (3 \bar{P} .)
y: Gefunden für Behring		$s_{yx} = 4,624$	$s_{yx} = 2,778$	$s_{yx} = 1,060$
x: Sollwert Behring				

Wertepaare (x; y) in Tabelle 6 zusammengestellt. Alle Geraden besitzen einen Korrelations-Koeffizienten von über 0,99. Die Geradenstreuungen sind unterschiedlich groß und schwanken zwischen 1,060 und in einem extremen Fall 66,285 (IgG).

Aufgrund der gefundenen Werte lassen sich anhand der Tabelle für die einzelnen Proteine und Plattentypen sowie bei Verwendung der einzelnen Standards die zu erwartenden Konzentrationen mit einer oft erheblichen Schwankungsbreite abschätzen.

Literatur

1. MANCINI, G., CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. (1965), *Immunochemistry* 2, 235—254. — 2. FAHEY, J. F. & MCKELVEY, E. M. (1965), *J. Immunol.* 94, 84—90. — 3. AUGENER, W. (1965), *Immunanalyse von Glykoproteinen*. In: H. PEETERS (Ed.): *Proc. XIIth Coll. Protides of the Biolog. Fluids*, Brügge 1964, 363—371, Elsevier-Amsterdam. — 4. FATEH-MOGHADAM, LAMERZ, R., EISENBURG, J. & KNEDEL, M. (1969), *Klin. Wochenschr.* 47, 129—140. — 5. SACHS, L. (1968), *Statistische Auswertungsmethoden*. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York.

Dr. R. Lamerz

Priv. Doz. Dr. A. Fateh-Moghadam

1. Medizinische Klinik der Universität München

8000 München 2

Ziemssenstr. 1a

Priv. Doz. Dr. M. Knedel

Klinisch-Chemisches Institut am Städt. Krankenhaus

München-Harlaching

8000 München 90

Sanatoriumsplatz 2